



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Determinación del Potencial de Membrana
Mitocondrial mediante citometría de flujo durante
el proceso de criopreservación de espermatozoides
epididimarios de alpacas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Pablo Samuel ALLAUCA ESPINO

ASESOR

Alexei Vicent SANTIANI ACOSTA

Lima, Perú

2017



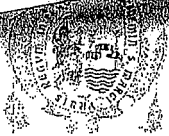
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Allauca P. Determinación del Potencial de Membrana Mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2017.



5-2
497

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO**

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **jueves 28 de setiembre del 2017**, a las **11:00 horas**, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0194-EPMV/FMV-2017, integrado por los siguientes profesores:

Wilfredo Huanca López
Alexei Santiani Acosta
Boris Lira Mejía
María Vásquez Cachay

Presidente del Jurado
Asesor de la Tesis
Miembro del Jurado
Miembro del Jurado

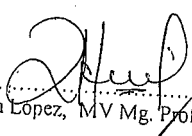
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **ALLAUCA ESPINO, PABLO SAMUEL**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

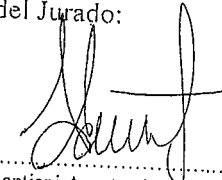
**"DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL
MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DURANTE EL PROCESO DE
CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE
ALPACAS"**

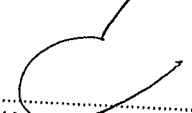
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISEIS (16)**.

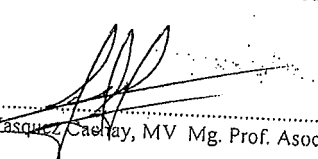
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **12:18 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


.....
Wilfredo Huanca López, MV Mg. Prof. Principal, D.E.


.....
Alexei Santiani Acosta, MV Dr. Prof. Asociado T.P.


.....
Boris Lira Mejía, MV Mg. Prof. Asociado T.C.


.....
María Vásquez Cachay, MV Mg. Prof. Asociado D.E.

ÍNDICE

Pág.

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Reproducción en CSA.....	3
2.1.1 Aportación a la economía peruana.....	3
2.1.2 Mejoramiento genético.....	4
2.1.3 Inseminación artificial (IA).....	5
2.1.4 Inseminación artificial (IA) utilizando semen congelado.....	6
2.1.5 Características de espermatozoides epididimarios.....	8
2.2 Criopreservación de semen.....	10
2.2.1 Proceso de congelamiento de semen.....	10
2.2.2 Shock térmico durante el proceso de congelación.....	10
2.2.3 Daños físicos y químicos en los espermatozoides.....	11
2.2.4 Daños a las membranas celulares.....	12
2.2.5 Daño oxidativo.....	12
2.2.6 Impacto potencial del uso de semen congelado en CSA.....	13
2.3 Mitocondrias espermáticas y citometría de flujo.....	14
2.3.1 Importancia mitocondrial en los espermatozoides.....	14
2.3.2 Actividad mitocondrial.....	15
2.3.3 Marcadores de evaluación de daño mitocondrial.....	15
2.3.4 Citometría como método de evaluación.....	17
2.3.5 Citometría de flujo para análisis seminal.....	17
2.3.6 Citometría de flujo y evaluación mitocondrial.....	18
2.3.7 Antecedentes de citometría de flujo y actividad mitocondrial.....	21
III. MATERIALES Y METODOS.....	22
3.1 Lugar de estudio.....	22
3.2 Tamaño muestral.....	22
3.3 Obtención de Muestras.....	23
3.3.1 Preparación del dilutor.....	23
3.3.2 Recuperación de espermatozoides epididimarios.....	24
3.3.3 Evaluación de calidad seminal (motilidad y concentración).....	24
3.3.4 Criopreservación.....	24
3.3.5 Descongelamiento.....	25
3.3.6 Evaluación de la motilidad post descongelamiento.....	25
3.3.7 Evaluación del porcentaje de espermatozoides con alto Potencial de membrana mitocondrial (PMM).....	25
3.3.8 Citometría de flujo.....	25
3.3.9 Controles de fluorescencia.....	26
3.3.10 Diseño experimental y observacional.....	27
3.3.7 Análisis de información.....	27
IV. RESULTADOS.....	29
V. DISCUSIÓN.....	34

VI. CONCLUSIONES.....	37
VII.BIBLIOGRAFIA.....	38

RESUMEN

El potencial de membrana mitocondrial (PMM) es uno de los parámetros espermáticos más importantes debido a que las mitocondrias son la principal fuente de ATP necesaria para la movilidad espermática en el tracto reproductivo de la hembra para lograr la fecundación. La criopreservación de espermatozoides es una técnica que permite y facilita el uso de material genético de alto valor. El objetivo de este estudio fue demostrar mediante la citometría de flujo que el porcentaje de espermatozoides de alpaca con alto PMM se reduce significativamente luego del proceso de criopreservación. Se trabajaron con 41 testículos de alpaca obtenidos del Camal Municipal de Ninacaca. Provincia de Pasco. Se recuperaron los espermatozoides de la cola del epidídimo con 1 mL de dilutor en base a leche descremada y se congelaron. Sólo fueron congeladas las muestras con mínimo 30% de motilidad y concentración de 50×10^6 espermatozoides/mL. La evaluación de PMM se realizó antes y después del proceso de criopreservación. Cada muestra se incubó durante 10 minutos a 38 °C con MitoTracker Deep Red (100 nM) para determinar el porcentaje de alto PMM, mediante citometría de flujo con imágenes. El efecto de la criopreservación en el porcentaje de espermatozoides con alto PMM fue evaluado mediante la prueba de T-student pareada. Asimismo, se correlacionaron los porcentajes de motilidad y espermatozoides con alto PMM. Se obtuvo un $49.82 \pm 12.41\%$ de alto PMM en muestras antes del proceso de criopreservación, el cual fue significativamente ($p < 0.05$) mayor al porcentaje de alto PMM de las muestras descongeladas ($34.97 \pm 9.96\%$). También se encontró una correlación positiva ($r: 0.62$; $p < 0.0001$) entre motilidad y PMM. Se concluye que el PMM se reduce significativamente luego del proceso de criopreservación, parámetro relacionado a la motilidad espermática.

Palabras clave: alpaca, espermatozoide, potencial de membrana mitocondrial, MitoTracker Deep Red 633.

ABSTRACT

Mitochondrial membrane potential (MMP) is one of the most important sperm parameters because mitochondrias are the main source of ATP necessary for sperm motility in the female reproductive tract to achieve fertilization. Sperm cryopreservation is a technique that allows and facilitates the use of high-value genetic material. The objective of this study was to demonstrate by imaging flow cytometry that the percentage of alpaca spermatozoa with high MMP is significantly reduced after the cryopreservation process. Forty-one alpaca testicles obtained from a local slaughterhouse in Ninacaca district, Province of Pasco were processed. Spermatozoa were recovered from the tail of the epididymis with 1 mL of extender based on skim milk. Only samples with a minimum of 30% motility and 50×10^6 sperm / mL concentration were cryopreserved. The MMP evaluation was performed before and after the cryopreservation process. Each sample was incubated for 10 minutes at 38 ° C with MitoTracker Deep Red (100 nM) to determine the percentage of high MMP by imaging flow cytometry. The effect of cryopreservation on the percentage of spermatozoa with high MMP was evaluated using a paired t-test. MMP and sperm motility were correlated using Pearson correlation test. Percentage of spermatozoa with high PMM obtained in samples before the cryopreservation ($49.82 \pm 12.41\%$) was significantly ($p < 0.05$) higher than in thawed samples ($34.97 \pm 9.96\%$). A positive correlation ($r: 0.62$; $p < 0.0001$) between motility and PMM was also found. It is concluded that MMP is significantly reduced after the cryopreservation process, a parameter related to sperm motility.

Key words: alpaca, spermatozoa, mitochondrial membrane potential, MitoTracker Deep Red 633

LISTA DE TABLAS:

Tabla N°1	Espermatozoides epididimarios de alpacas, frescos y descongelados, analizados con el fluorocromo MitoTracker Deep Red para evaluar el PMM.
Tabla N°2	Evaluación de la motilidad y potencial de membrana mitocondrial mediante el estudio estadístico de t de Student de espermatozoides epididimarios de alpaca, frescos y descongelados.
Tabla N°3	Correlación de Pearson entre motilidad y el alto potencial de membrana mitocondrial, presentada por espermatozoides epididimarios de alpaca.

LISTA DE FIGURAS

Figura N°1	Programa #7 de congelamiento automático Cryobath (Cryologic).
Figura N°2	Esquema de presentación de histograma de espermatozoides.
Figura N°3	Esquema de evaluación del PMM espermática según su etapa de procesamiento.
Figura N°4	Histogramas de muestras de espermatozoides epididimarios de alpaca analizados mediante el citómetro de flujo.
Figura N°5	Ejemplos de espermatozoides epididimarios de alpaca evaluados mediante el sistema analizador de imagen del citómetro de flujo.
Figura N°6	Correlación entre el porcentaje de motilidad y alto PMM, presentada por espermatozoides epididimarios de alpaca.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de camélidos sudamericanos (csa) constituye uno de los recursos económicos más importantes en las regiones altoandinas. De las cuatro especies existentes, dos son domésticas: la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*), y dos silvestres: la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*). La crianza de alpacas tienen como objetivo la obtención de dos principales productos: la fibra y su carne; considerándose a la producción de fibra de alpaca la de mayor importancia e interés en el mercado textil del comercio internacional, siendo en potencia un producto importante de exportación para la economía nacional. Las limitaciones tecnológicas de los productores alpaqueros y las dificultades reproductivas que presentan estos animales conllevan a un interés científico en ayudar en este punto, donde tal como indica Fernández (2006), utilizando biotecnologías de asistencias reproductivas podríamos seleccionar y obtener animales con características productivas deseadas las cuales mejoren la calidad y rentabilidad en el comercio.

El uso de biotecnologías reproductivas es útil y conocida en otras especies en producción, lográndose animales genéticamente superiores y reduciendo el tiempo generacional. Sin embargo, la complejidad en las características fisiológicas reproductivas en las alpacas no ha permitido su distribución y utilidad deseada (Fernández-Baca, 1993). Para ello, y para la mejora en la producción de esta especie, es necesaria la distribución de material genético de alta calidad hacia distintas áreas geográficas donde se vean beneficiadas por la obtención de nuevas generaciones de animales genéticamente superiores.

Por lo tanto, es necesario realizar evaluaciones de distintos parámetros del material genético, el cual nos garantice que es de calidad suficiente y tenga un alto porcentaje de éxito para los fines reproductivos. Dentro de los parámetros espermáticos a evaluar se tiene al volumen, pH, motilidad, concentración, morfología, viabilidad. Actualmente, un nuevo parámetro a utilizar es el potencial de membrana mitocondrial (PMM) de los espermatozoides, el cual podrá ser un indicador directo de motilidad e indirecto de capacidad fecundante (Manosalva et al., 2005). El interés en evaluar la

actividad mitocondrial deriva de su importancia en la producción de adenosina-tri-fosfato (ATP), producido por fosforilación oxidativa y necesario para la motilidad y la fecundación (Andrade, 2005).

Recientemente, la técnica de citometría de flujo ha ofrecido una mayor precisión en la forma de medir la calidad del semen (Hallap et al., 2005). Utilizando la citometría, se ha reportado la evaluación del porcentaje de espermatozoides con alto PMM como parámetro en diversas especies dentro de las que se ha incluido espermatozoides frescos de alpacas (Cheuquemán et al., 2013). Una de las tinciones específicas para mitocondrias es el MitoTracker® Deep Red, cuyas moléculas se difunden a través de la membrana plasmática y se unen específicamente a los lípidos de membrana de las mitocondrias funcionales. Las principales ventajas son que presentan especificidad, fotoestabilidad, y elevada sensibilidad al ser incorporado en distintos protocolos (García, 2014).

Trabajos similares en esa nos reportan algunos antecedentes, tal como el realizado por Santiani et al., (2016) donde evaluaron el PMM en espermatozoides frescos epididimarios de alpaca con los fluorocromos MitoTracker® Deep Red y MitoTracker CMXRos. También el trabajo realizado por Cheuquemán et al., (2013) donde nos reporta la evaluación de PMM en muestras de eyaculado de alpacas utilizando el fluorocromo JC-1. Adicionalmente se tiene los reportes del trabajo de Santiani et al., (2015) donde evaluaron muestras descongeladas epididimarias de alpaca, utilizando en este caso el fluorocromo MitoTracker CMXRos. Sin embargo, se desconoce el efecto de la criopreservación sobre el PMM en espermatozoides de alpaca. Habiéndose demostrado que la criopreservación afecta negativamente otros parámetros de funcionamiento espermático es de esperarse que el porcentaje de espermatozoides con alto PMM se vea afectado por este proceso (Castelo, 2008). Por lo tanto el objetivo del presente estudio es demostrar mediante la citometría de flujo que el porcentaje de espermatozoides de alpaca con alto PMM se reduce significativamente luego del proceso de criopreservación.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

2.1 Reproducción en camélidos sudamericanos (csa):

2.1.1 Aportación a la economía peruana:

Los csa domésticos constituyen el principal medio de utilización productiva de extensas áreas de pastos naturales en las zonas alto-andinas donde no es posible la agricultura y la crianza exitosa de otras especies de animales domésticos. Los csa convierten con eficiencia la vegetación nativa de estos ambientes en carne y fibras de alta calidad, además sus pieles y cueros tienen múltiples usos industriales y artesanales (Iñiguez y Alem, 1996).

De Los Ríos (2006), estima que al menos un millón y medio de personas se dedican a la crianza de camélidos en la región alto-andina del Perú. Las áreas productoras de csa en el Perú incluyen las provincias con mayor pobreza y marginalización.

Contamos con 3.685.500 cabezas de alpacas en el territorio peruano, según indica CENAGRO (2012), de los que alrededor del 20% son productores fibras, los cuales producen alrededor de 4.3 toneladas de fibras anualmente.

Los sistemas de cría de la alpaca en el Perú son en su mayoría comunitarios, con productores de escasos recursos (Quispe et al., 2009). Los sistemas de manejo son tradicionales con limitada adopción de tecnologías conducentes a una mejora de la productividad, por tanto los rendimientos por animal y rebaño aún son bajos (Quispe et al., 2005).

La industria textil refiere a las fibras de alpaca como fibras especiales y los artículos confeccionados con ellas, están clasificados como artículos de lujo (Wang et al., 2003). Los tejidos elaborados con alpaca son comparables a los elaborados con lana ovina pero con un diámetro promedio 3 a 4 micras menor (Quispe et al, 2005).

Los vellones de ovinos contrasta con los rendimientos en limpio de los vellones de alpaca, que son altos (87% a 95%) permitiendo un proceso industrial menos oneroso (Quispe et al., 2009). Exhiben alta resistencia a la tracción (con valores mayores a 40 N/ktex), una condición importante en el proceso industrial (Xungai et al., 2003).

La producción de carne es un renglón importante en la crianza de camélidos. Primero, porque se trata de un alimento de alto valor nutritivo que contribuye de manera importante a la nutrición de los pueblos alto andinos, y segundo, porque con un debido reordenamiento de la estructura de los rebaños y mejora del manejo y la sanidad, es posible obtener beneficios económicos comparables con el aporte de la fibra (FAO, 2005).

2.1.2 Mejoramiento genético animal:

El mejoramiento genético animal consiste en aplicar principios biológicos, económicos y matemáticos, con el fin de encontrar estrategias óptimas para aprovechar la variación genética existente en una especie de animales en particular para maximizar su mérito. Esto involucra tanto la variación genética entre los individuos de una raza, como la variación entre razas y cruza (Montaldo, 1998).

El mejoramiento genético animal involucra procesos de evaluación genética y difusión del material genético seleccionado, en los cuales se pueden usar tecnologías reproductivas artificiales tales como la inseminación artificial, la ovulación múltiple y transferencia embrionaria, la fertilización in vitro de embriones, así como el uso de marcadores de ADN (Montaldo, 1998).

Los reportes sobre métodos de colección de semen son diversos, desde el uso de sacos vaginales (Mogrovejo et al., 1952), esponjas vaginales (San Martín, 1961) y electroeyaculación (Fernández-Baca y Calderón, 1965).

Posteriormente se reporta el uso de una vagina artificial adaptada de ovinos (Sumar y Leyva, 1981), que si bien mejora la técnica de colección, aún presenta dificultades para mantener una temperatura adecuada durante el largo de la cópula.

El uso de una frazadilla eléctrica cubriendo la vagina artificial, permite algunas mejoras en la técnica de colección, facilitando el mantenimiento de la temperatura (Gauly y Leindiger, 1995). Igualmente, el uso de un maniquí (Sumar y Leyva, 1981) o la colección con hembra receptiva (Gauly y Leindiger, 1995; Huanca y Gauly, 2001) se presentan como alternativas para la colección de una muestra de semen fisiológicamente normal; sin embargo, se requiere un entrenamiento de los animales y no siempre todos los machos llegan a aceptar el maniquí; mientras que el uso de hembra receptiva genera incomodidades en el operador.

Otras alternativas de colección incluyen la colección de semen mediante una fístula uretral y una técnica más eficaz ha sido reportada por Giuliano et al. (2007), mediante la colección de semen con uso de electroeyaculación pero con una previa anestesia del animal, con resultados interesantes y sin contaminación del semen con orina.

Los estudios sobre conservación de semen no son totalmente satisfactorios, particularidades como la alta viscosidad del semen de alpacas y llamas (Lichtenwalner et al., 1996; Bravo et al., 1997) se constituyen en factores que dificultan el desarrollo de las técnicas de conservación, dificultando la determinación de la concentración, morfología y motilidad espermática, además del alto porcentaje de espermatozoides anormales (Fernández-Baca, 1993) y una motilidad oscilatoria (Garnica et al., 1995). Intentos para reducir la alta viscosidad ha sido reportada, mediante, con el uso de enzimas como la collagenasa, hialuronidasa y tripsina (Bravo et al. 2000) o mediante una acción mecánica (Valdivia. 1999).

2.1.3 Inseminación artificial (IA):

La IA es una herramienta reproductiva ampliamente utilizada en diversas especies domésticas que permite el uso extensivo de machos con aptitud genética superior. Escasos trabajos de IA en csa domésticos han sido publicados hasta el presente, debido quizás a la falta de una metodología simple y confiable de extracción de semen y a las pobres características cualitativas y cuantitativas que presenta el semen de estas especies (Aller, 1997).

En el caso de los csa, el eyaculado es muy característico de la especie por tener poco volumen, poca concentración y gran viscosidad comparada a cualquier otra especie, por lo que resulta muy difícil realizar tanto la evaluación microscópica como macroscópica del eyaculado y así poder

entablar una relación entre características del semen normal y el umbral de fertilidad (Cheuqueman et al., 2013).

Diferentes métodos de extracción de semen han sido experimentados hasta el momento, como ser, fundas vaginales, electroeyaculación, esponjas intravaginales, maniquí equipado con vagina artificial o el uso de hembra receptivas. La IA es una técnica reproductiva utilizada para el mejoramiento genético animal que no ha sido todavía desarrollada completamente en los csa (Aller, 1997).

Los resultados observados son variables y si bien se observa motilidad espermática, esta característica no siempre se ha reflejado en mejoras en la tasa de preñez. El primer reporte sobre inseminación artificial en alpacas fue realizado por Fernández-Baca y Novoa (1968), utilizando semen sin diluir de 2 vicuñas y 4 paco-vicuñas, obteniéndose una sola cría de 42 alpacas inseminadas. Posteriormente se ha reportado la inseminación de 83 alpacas y 11 llamas con semen fresco obtenido por electroeyaculación de una vicuña y 4 paco-vicuñas, con una tasa de 48% en hembras inducidas a ovulación con la hormona Gonadotrópica Coriónica Humana y 11% en hembras inducidas a ovulación con machos vasectomizados (Leyva et al., 1977).

Igualmente se reporta una tasa de preñez del 73% a la IA con semen fresco y depositado en los cuernos uterinos, así como un 67% de preñez a la IA por laparoscopia (Bravo et al., 1996), similar al reporte de Pacheco (1996). Sin embargo, todas esas experiencias fueron realizadas en centros experimentales, a diferencia de una experiencia a nivel de criadores particulares, donde se reporta una tasa de preñez del 51% de 207 alpacas inseminadas con semen fresco diluido con una solución de BSA + Glucosa e induciendo la ovulación con un análogo de GnRH o LH, entre 24 a 26 horas antes de la Inseminación (Apaza et al., 2001).

2.1.4 Inseminación artificial (IA) utilizando semen congelado:

La IA con semen congelado es una de las más importantes tecnologías reproductivas en la producción de animales domésticos y combinada con una prueba de progenie, ha contribuido sustancialmente en el mejoramiento genético en animales, especialmente cuando fue posible disponer de semen congelado de machos de alta calidad genética. En camélidos, si bien existen reportes sobre el desarrollo de la IA y aun cuando puede ser considerada una alternativa

tecnológica, aun no se han superado las limitantes existentes, como el desarrollo de protocolos de criopreservación, limitando por ahora al desarrollo de la IA con el uso de semen fresco (Huanca y Adams, 2007), con las consiguientes dificultades para permitir una amplia difusión de reproductores genéticamente superiores.

Existen diferencias fisiológicas entre los camélidos y otras especies domésticas, siendo una primera diferencia el hecho que las hembras camélicas son especies de ovulación inducida, es decir que se requiere el estímulo de la copula para inducir ovulación (San Martín et al., 1968), pero esta diferencia más que una dificultad puede ser una ventaja para la aplicación de la IA. Sin embargo, otras diferencias, como la dificultad para la colección de semen debido a las características de cópula de la hembra (posición y duración); así como el manejo del semen debido a su naturaleza viscosa; han sido los principales obstáculos para el desarrollo masivo de la IA, a los que hay que agregar la baja concentración de espermatozoides y el alto porcentaje de anormales (Fernández-Baca, 1993).

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante IA han causado un gran impacto sobre la reproducción animal y humana, debido a que favorece el comercio nacional e internacional de razas o líneas genéticas, formación de bancos de germoplasma, reserva genética, conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Aller et al., 2003).

En csa existe muy poca información sobre IA usando semen congelado (Bravo et al., 1996); quizás debido a la falta de una metodología fiable de conservación de semen en csa.

La conservación de las estructuras espermáticas y de su capacidad fertilizante exige la reducción o interrupción reversible del metabolismo celular. Esto se consigue mediante el uso de dilutores y la refrigeración o congelación que deprimen el metabolismo. Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a diversos tipos de estrés, los cuales pueden inducir, en la célula espermática, daños letales o subletales los cuales comprometen su funcionalidad (Silva et al. 2003).

La optimización de protocolos de criopreservación debe contemplar no solo la obtención de un alto número de espermatozoides sobrevivientes sino también la habilidad funcional de esta población. Para lograr esto, es necesario comprender a qué tipo de estrés se ven sometidos los

espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación así como la manera en que las células responden a las agresiones fisicoquímicas medioambientales (Silva et al. 2003).

Los reportes sobre semen congelado son muy escasos; así tenemos que un estudio realizado con semen obtenido por electroeyaculación y diluido con Tris – Yema huevo – Glicerol, solo se observó un 10% de motilidad post descongelamiento (McEvoy et al., 1992); así mismo, otro estudio con semen tratado con colagenasa y posteriormente diluido con citrato de sodio – Yema huevo – Glicerol (7%) permite obtener una motilidad entre el 30 – 40% (Bravo, 1996). El uso de etilenglicol como agente crioprotector ha sido reportado, permitiendo una tasa de motilidad post descongelamiento del 20% (Santiani et al., 2005).

A pesar de estos resultados a la fecha no se ha reportado estudios que nos permitan señalar la factibilidad de congelar semen de camélidos. Posiblemente, como sucede con otras especies, no va a ser fácil congelar semen, más aún si a las dificultades de contar con un dilutor apropiado, hay que considerar los altos porcentajes de anormalidades presentes en los eyaculados. Los resultados obtenidos sugieren que es posible la colección de semen con vagina artificial colocada en un maniquí y envuelta con una frazadilla eléctrica, así como el desarrollo de la IA con semen fresco; sin embargo se requieren nuevos estudios que permitan desarrollo protocolos de criopreservación de semen, por lo que parece que el uso de la IA en csa va a estar, por ahora, restringido al uso de semen fresco diluido y utilizado inmediatamente, con resultados cercanos al 50%.

2.1.5 Características de espermatozoides epididimarios:

El epidídimo tiene fundamentalmente dos funciones: La maduración y el almacenamiento espermático (Chenoweth, 1997; Mortimer, 1997). La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y el almacenamiento ocurre en la cola del epidídimo (Robaire y Viger, 1995). Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo con movilidad y capacidad fertilizante, poco tiempo después de la muerte del animal, que podrían ser procesados y congelados para su posterior uso en IA (Albers y Barrios, 2006).

La recuperación post-orquiectomía o post-mortem de gametos a partir de los órganos reproductivos y la posterior criopreservación de los mismos, es una herramienta sumamente

interesante tanto para resguardar el material genético como para crear bancos de reserva de este material. Cabe anotar que en el epidídimo ocurre la maduración funcional y morfológica de los espermatozoides de todas las especies de mamíferos y allí se almacenan por algunos días o semanas en una condición viable y fértil antes de la eyaculación (Comizzoli et al., 2001).

Diversos estudios han demostrado que los espermatozoides epididimarios pueden ser utilizados en gran variedad de biotecnologías como lo son: IA, fertilización in vitro e inyección intracitoplasmática de espermatozoides con resultados satisfactorios (James et al., 2002).

Muchos métodos de recuperación han sido reportados y varían según la especie y el autor. En el caso de las pequeñas especies, debido al tamaño del epidídimo, el método de preferencia es el float el cual consiste en reducir o cortar la cola del epidídimo y dejarla en un medio gelatinoso. De esta manera, los espermatozoides migran al medio y se recuperan por filtración (Yu et al., 2002). Esta técnica también ha sido utilizada en grandes especies (Silva et al., 2003).

Una técnica similar es hacer numerosos cortes en la cola de epidídimo y presionar suavemente la cola para recolectar los espermatozoides por extravasación (Kaabi et al., 1981).

Otro método es el de promover un flujo retrógrado en la cola del epidídimo, mediante la aplicación de presión desde el conducto deferente hasta que el contenido de la cola del epidídimo salga a través de un corte hecho en la unión con el cuerpo del epidídimo (Garde et al., 1994). La presión se genera con una jeringa que inyecta aire o líquido diluyente (Comizzoli et al., 2001).

Luego de la castración cada testículo debe ser lavado con solución salina y almacenado en un contenedor indicado para mantener los testículos o epidídimos a una temperatura de 4 °C. James et al. (2002) demostraron que los espermatozoides de epidídimo son viables hasta 96 horas post mortem, siempre y cuando los epidídimos sean almacenados a una temperatura de 4 °C.

Los avances ocurridos en este tipo de biotecnología hacen posible que ante la muerte repentina o castración inevitable, la recuperación espermática epididimal y la criopreservación de gametos permita resguardar el material genético animal. Además, aun cuando no sea posible recuperar y criopreservar inmediatamente los gametos, el almacenado temporal de los espermatozoides epididimarios a 4 °C al menos en solución fisiológica durante 24 ó 48 horas, permite recuperar

espermatozoides viables en un laboratorio para la recuperación y criopreservación espermática (James et al., 2002).

2.2 Criopreservación de semen:

2.2.1 Proceso de congelamiento de semen:

Una de las cuestiones importantes relacionadas con la eficiencia de las técnicas de criopreservación es la velocidad de reducción de la temperatura durante el congelamiento. El tipo de curva utilizada durante la congelación tiene influencia directa en el grado de las lesiones celulares, debido a procesos de deshidratación y formación de cristales de hielo intracelulares (Moore et al., 2006).

Existen básicamente dos métodos de congelación de semen, el convencional y el automatizado. En el método convencional las pajillas son acomodadas en una gradilla de metal y refrigeradas a 4 °C, durante 4 horas, en una nevera doméstica. Luego de este periodo, la gradilla de metal con las pajillas, es transferida para una caja de poliestireno, conteniendo nitrógeno líquido y acomodadas 6 cm por encima de la superficie líquida durante 20 minutos. Finalmente, las pajillas son inmersas en nitrógeno líquido y, posteriormente, almacenadas en un termo de nitrógeno. Por el método automatizado, luego del envase, las pajillas son refrigeradas y congeladas utilizando un equipo congelador de semen automático con un protocolo estándar según recomendaciones del fabricante. Luego de la congelación las pajillas son almacenadas en el termo de nitrógeno líquido (Vasconcelos-Filho, 2010).

2.2.2 Shock térmico durante el proceso de criopreservación:

Shock térmico es el término que describe la respuesta de estrés con que responde el espermatozoide a una disminución de temperatura. El daño espermático que resulta de un choque térmico va a depender no solo de la baja de temperatura sino también de la velocidad con que esta ocurra (Morel, 1999).

Se ha establecido que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación, si la velocidad de congelación es demasiado rápida o

demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (Stornelli et al., 2005).

Está comprobado que al reducir la temperatura por debajo de los 20°C el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática, pero no es sino cuando se somete a temperaturas entre los 0°C y los -20°C, o hasta los -60°C, que el espermatozoide sufre efectos de descompensación iónica y de líquidos suficientemente graves para causar un shock térmico. Esto se puede detectar al microscopio por la presencia de espermatozoides con la cola doblada, con pérdida de motilidad por la disminución de energía, o realizando movimientos en círculo, lo cual se debe al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y a la salida de iones y moléculas (Palacios, 2005).

2.2.3 Daños físicos y químicos a los espermatozoides:

En términos generales, los daños que sufre el espermatozoide durante los procesos de criopreservación son principalmente físico-químicos, debido al estrés osmótico que sufre la célula al deshidratarse, la distorsión de la membrana y a la formación de cristales de hielo (Palacios, 2005).

En un espermatozoide sin protección se formará hielo intra y extracelular si se enfría a temperaturas bajo cero. El hielo crece sin control formando grandes cristales de hielo intracelular que acaban destruyendo la célula. El daño se produce por dos mecanismos: por la acción de arado que ejerce el hielo en crecimiento y por el daño osmótico que causa la acumulación de sales y otros solutos que se originan al irse fijando las moléculas de agua a los núcleos de hielo (Ortega, 2008).

Estos cristales de agua pura se comienzan a formar al bajar de -5°C, y por el mismo fenómeno de cristalización todos los solutos quedan separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aún no se congela (agua pre-congelada). El termino pre-congelamiento define al momento umbral antes de que una célula o su ambiente sea congelado (Palacios, 2005). Este fenómeno lleva a un aumento en la presión osmótica, y al ser el agua dentro del espermatozoide más lenta en formar cristales que el agua fuera de este (Morel, 1999), ocurre una salida de agua al medio extracelular por gradiente osmótico, a través de la membrana plasmática. Como resultado de esto el espermatozoide se deshidrata.

La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada (Stornelli et al., 2005). Por tanto las condiciones hipertónicas a las que sometemos al espermatozoide durante la congelación originan una pérdida osmótica de agua que dependerá de la curva de congelación.

2.2.4 Daños a las membranas celulares:

Por otro lado, el proceso de congelación da lugar también a cambios de fase en la membrana celular y pueden alterar receptores de membrana y otras proteínas interfiriendo en su capacidad de reconocimiento, de transporte de agua e iones a través de los canales o poros de membrana (Ortega, 2008).

Cuando los espermatozoides están alterados, los iones Na^+ y Ca^{++} que entran a las células espermáticas son retirados por medio de transporte activo. A 5 °C la permeabilidad al Ca^{++} crece significativamente, superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de Ca^{++} . Así, el Ca^{++} se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos (Palma, 2001).

Este daño se manifiesta en una disminución de la motilidad espermática, y posiblemente afectando la morfología del acrosoma (Morel, 1999). Se postula que el acrosoma sufre más con estas alteraciones, una pérdida mayor de capacidad fecundante de la que sería esperada de la reducción de la motilidad (Palma, 2001).

2.2.5 Daño oxidativo

El espermatozoide, como toda célula, aprovecha sus nutrientes (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) a través de procesos oxidativos, de los cuales obtiene energía para mantener su viabilidad y funciones. El más importante es el que se lleva a cabo en la mitocondria a través de la cadena respiratoria, principal fuente de ATP y también de radicales libres (ROS) (Membrillo et al., 2003).

Los ROS son especies químicas que tienen un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas; pueden causar daño por reaccionar con las diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad. La criopreservación somete al espermatozoide a un estrés oxidante y posible daño del ADN (Membrillo et al., 2003).

El aumento de los ROS puede dañar a los espermatozoides y una de las principales causas del deterioro espermático es el estrés oxidante, que causa peroxidación de los lípidos de la membrana, modificación de su fluidez y alteración de su permeabilidad, lo que puede conducir a la muerte celular. La membrana de los espermatozoides contiene una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, lo que le brinda una alta susceptibilidad a los problemas de daño oxidativo (oxidación o peroxidación), alterando la posibilidad de fecundación (Membrillo et al., 2003). Además, la generación de ROS por espermatozoides dañados tiene un importante impacto sobre las células viables restantes, ya que representan un daño acumulativo para los espermatozoides en almacenamiento (Membrillo et al., 2003).

Aunque los espermatozoides son protegidos por sistemas de defensa antioxidante, estos pueden ser rebasados bajo situaciones en las que las ROS son generadas en exceso, lo que conduce al estrés oxidativo (Membrillo et al., 2003).

Por otro lado, mientras la producción incontrolada de ROS tiene un efecto negativo en la funcionalidad espermática, la producción controlada de ROS juega un papel fisiológico importante en ciertos eventos tales como; capacitación espermática, reacción acrosomal, hiperactivación y la fusión espermatozoide y ovocito (Morel, 1999).

2.2.6 Impacto potencial del uso de semen congelado en csa

El empleo del semen congelado puede producir un gran impacto en el mejoramiento genético, al aumentar considerablemente el flujo de material genético hacia las majadas generales, así como al facilitar la comercialización de semen a nivel nacional e internacional (Gibbons, 2003).

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la IA, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores (Castelo et al., 2008).

Los intentos de criopreservar semen en csa han sido hasta la fecha insatisfactorios, debido a las características propias del semen de camélidos, la técnica de colección (Bustinza, 2001), falta de conocimiento sobre su composición, viscosidad y uso de dilutores (Bustinza, 2001).

Entre los estudios más importantes realizados en criopreservación de semen de csa está el trabajo de Bravo et al., (1996) usando semen de alpaca obtuvo un porcentaje de motilidad post descongelamiento de 46.7% y en llama de 45%, siendo estos los mayores obtenidos hasta la fecha, sin embargo no ha sido posible reproducir la metodología.

Estudios posteriores reportaron tasas inferiores de motilidad post descongelamiento tales como las mencionadas por Vaughan et al., (2003) que obtuvo porcentajes de 17.4%; Pérez, (2006), usando diferentes concentraciones de crioprotectores, reportó motilidades de 22.5% a 41%; Santiani et al., (2005), reportó la obtención de motilidades que iban desde 4 a 20%, Burgel et al., (2001), obtuvo una motilidad post descongelamiento menor a 10% y Aller et al., (2003), obtuvo un 20% de motilidad postdescongelamiento.

2.3 Mitochondrias espermáticas y citometría de Flujo:

2.3.1 Importancia mitocondrial en los espermatozoides:

Las mitocondrias se encuentran entre las organelas de mayor importancia con múltiples funciones celulares. Además de su función principal para producir ATP, las mitocondrias también contribuyen a muchos procesos fisiológicos, tales como calcio homeostasis, apoptosis, lípidos y metabolismo de los aminoácidos, y otros (Logan, 2007; Suen et al, 2008; Tait y Green, 2012).

Las mitocondrias se cree que son las organelas más importantes para la evaluación de la calidad del esperma, y esto puede ser debido al hecho de que las mitocondrias contienen su propio ADN y el potencial de membrana que puede ser fácilmente examinado in vitro para reflejar la integridad del ADN del esperma y la motilidad, respectivamente (Carra et al., 2004, Amaral y Ramalho-Santos, 2010).

Al igual que en otras células, hay dos sistemas de producción de energía dentro de las células de esperma, es decir, la fosforilación oxidativa mitocondrial y la glucólisis. Sin embargo, las

mitocondrias son la fuente de energía principal para la movilidad de los espermatozoides (Piomboni et al., 2012).

Un concepto general es que los espermatozoides son capaces de modular la glucólisis y las funciones de la fosforilación oxidativa para satisfacer su energía necesaria en función de las diferentes condiciones y etapas de fertilización (John y John, 2011).

La glucólisis es de vital importancia, incluso exclusivo recurso para la producción de ATP en los espermatozoides (Peterson y Freund, 1970).

Debido a que el mantenimiento del potencial de membrana con carga positiva es un requisito previo en las mitocondrias para poder producir ATP, muchos colorantes fluorescentes comerciales son ampliamente utilizados para examinar el potencial de membrana mitocondrial y para evaluar la salud mitocondrial y la calidad celular (Liesa et al., 2009). La citometría de flujo, es utilizada para evaluar espermatozoides de buena calidad y examinar la integridad de las mitocondrias (Marchetti et al., 2002).

2.3.2 Actividad mitocondrial:

La actividad mitocondrial puede ser evaluada simultáneamente con marcadores fluorescentes. El interés en evaluar esta estructura deriva de la importancia de las mitocondrias en la producción de ATP, producido por fosforilación oxidativa y necesario para la motilidad y la fertilización (O'Connell et al., 2002).

Se conocen los efectos de la congelación en la parte intermedia del espermatozoide y la ruptura de la membrana (Jones y Stewart, 1979). La disminución de la motilidad puede ser atribuida a la pérdida de la función mitocondrial (O'Connell et al., 2002) y la ruptura de la membrana mitocondrial puede ser un acontecimiento inicial potenciador de la muerte celular (Henry et al., 1993). Sin embargo, la susceptibilidad de las membranas plasmáticas y mitocondrial a la criopreservación puede diferir dependiendo del tipo de crioprotector utilizado (O'Connell et al., 2002).

2.3.3 Marcadores de evaluación del daño mitocondrial:

Los trabajos de Harrison y Vickers (1990), indican que la membrana plasmática y mitocondrial pueden responder al shock térmico de modos distintos. Para estos autores, la pérdida de la impermeabilidad plasmática induce una rápida pérdida de componentes intracelulares y como consecuencia inmediata se produce una insuficiencia de nucleótidos como la adenina que no estarán disponibles para la fosforilación oxidativa; hecho que afectará a la motilidad, independientemente de la potencial capacidad de la mitocondria para proveer energía. En este sentido, el marcador mitocondrial Rodamina 123 (R123) ha sido utilizado en distintos trabajos con el fin de evaluar la funcionalidad de esta organela del espermatozoide.

La especificidad de la R123 para la mitocondria fue descrita por Johnson et al. (1980), quedando probado que sería altamente improbable que otras estructuras citoplasmáticas puedan ser teñidas con la R123. Este marcador fluorescente permite la localización de las mitocondrias en células vivas, dada su elevada selectividad por esta organela, posibilitando la detección de alteraciones en la distribución, forma y organización mitocondrial (Jonhson et al., 1980). La R123 tiene una carga positiva en un pH fisiológico y parece que su acumulación selectiva en las mitocondrias de las células vivas se basa en la atracción entre sus moléculas y en el potencial eléctrico negativo y relativamente elevado que tiene la mitocondria funcional (Jonhson et al., 1980; 1981; Chen et al., 1982).

Los trabajos de Graham et al. (1990) han confirmado que la R123 puede ser utilizada en la detección de células espermáticas y que su intensa acumulación se verificó en mitocondrias completamente funcionales, de hecho, las células muertas no acumularon este marcador. En el trabajo de Fraser et al. (2002), cuando la proporción de células que exhibían fluorescencia con R123 disminuía, esta se acompañaba de un aumento de células que marcaban con PI o H33258. En cuanto al impacto de la R123 en el espermatozoide, esta no tiene efectos citotóxicos evidentes (Johnson et al., 1980), ni afecta en los procesos metabólicos, como su consumo de oxígeno o la producción de dióxido de carbono (Downing et al., 1991).

La R123 puede ser utilizada sola (Tucker et al., 1986) o, más frecuentemente, asociada a marcadores de viabilidad como es el caso del PI (Auger et al., 1989), o en tinción triple, asociada al diacetato de carboxidimetil-fluoresceína (CDMFDA)-PI (Ericsson et al., 1993), con el PI-PE-PSA (Graham et al., 1990) o con PI-Fitc-PNA (Carvajal et al., 2004), para análisis simultáneo de viabilidad y estado acrosomal. La utilización conjunta R123-PI parece adecuada para evaluar

espermatozoides suspendidos en medios con yema de huevo, caracterizados por una cierta opacidad (Fraser et al., 2002).

2.3.4 Citometría como método de evaluación:

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz (Barrera et al., 2004).

Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad y, por supuesto, cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo (Barrera et al., 2004).

La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular. Aunque, desde el punto de vista cronológico, la citometría de flujo es una tecnología relativamente reciente, sus características especiales como técnica de análisis celular han hecho que en la última década su uso se haya extendido de forma rápida, desde los laboratorios de investigación básica hasta los laboratorios clínicos (Pérez, 2006).

La citometría de flujo representa un método rápido objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión. El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (Pérez, 2006).

2.3.5 Citometría de flujo para análisis seminal:

Especial atención merece el uso de los citómetros de flujos para el análisis seminal. La citometría de flujo es una técnica que consiste en el análisis rápido de células individualizadas y

orgánulos subcelulares, suspendidos en un flujo laminar, sobre los que incide un rayo láser. El análisis de la desviación de haz de luz, de su intensidad y de la fluorescencia que emiten los distintos fluorocromos con los que podemos marcar las células nos da información sobre el estado funcional, presencia o ausencia de determinados antígenos, pH, estado Redox, etc. Otra gran ventaja de esta técnica es que permite evaluar un gran número de espermatozoides en muy poco tiempo, entre 5. 000 y 10. 000 espermatozoides pueden ser evaluados en solamente 1 segundo, lo que permite, detectar ligeras diferencias entre eyaculados o estudiar la distribución de subpoblaciones espermáticas en los mismos (Peña y Rodríguez, 2006).

Así pues, la citometría de flujo se presenta como uno de los métodos de gran valor en la predicción de la fertilidad (Silva, 2003), ya que nos permite poder evaluar desde la integridad y funcionalidad de las membranas espermáticas plasmática y acrosomal, del ADN espermático, del a actividad de las mitocondrias hasta la fluidez de la membrana y la producción de ROS entre otras características, lo que determinará la existencia de distintas subpoblaciones en función de los parámetros evaluados, favoreciendo el estudio de la importancia de cada una de estas subpoblaciones en el éxito de la fecundación.

2.3.6 Citometría de flujo y evaluación mitocondrial:

Este marcador ha sido utilizado con éxito en la investigación de la actividad mitocondrial en distintos estudios. Como ejemplo tenemos los estudios del impacto de la criopreservación en la actividad mitocondrial del espermatozoide del morueco (Windsor y White, 1995) y del hombre (O'Connell et al., 2002), en la comparación de la eficacia de distintos protocolos de congelación del semen bovino (Karabinus et al., 1991), o humano (Henry et al., 1993), e incluso para estudiar la posible correlación entre los estudios citométricos de la actividad mitocondrial y los parámetros clásicos de análisis de la calidad seminal y la fertilidad in vivo (Ericsson et al., 1993). También ha sido utilizada en el estudio de los efectos de la citometría de flujo en el espermatozoide humano (Auger et al., 1993), en la evaluación de distintos crioprotectores en el espermatozoide de trucha (De Baulny et al., 1997), o en la evaluación de los efectos de los antibióticos en la refrigeración (Segovia et al., 2000).

La utilización de la R123 conjuntamente con la microscopía de fluorescencia posibilita la monitorización del potencial de membrana mitocondrial en células vivas de modo que las variaciones en la intensidad fluorescente reflejan las variaciones intracelulares del potencial de

membrana mitocondrial (PMM) (Jonhson et al., 1980). Tras estas primeras investigaciones con microscopía de fluorescencia esta tinción se aplicó con citometría de flujo para la evaluación del PMM del espermatozoide y de células somáticas cultivadas (Chen et al., 1982; Evenson et al., 1982). Los trabajos de Evenson et al. (1982) han evaluado simultáneamente la viabilidad espermática, recurriendo al bromuro de etidio. Se ha concluido que las alteraciones de la fluorescencia de la R123 se deben a alteraciones en el potencial de membrana de la mitocondria y no en su número.

Además, se ha observado una buena correlación entre motilidad espermática e intensidad de coloración de R123. Tucker et al. (1986) han ampliado los conocimientos sobre las funciones de la R123 en el espermatozoide humano criopreservado e incubado a 37°C. En este trabajo, la R123 se reveló como un método preciso de evaluación de la viabilidad y del estado metabólico del espermatozoide. En el espermatozoide metabólicamente activo, su rápido y previsible transporte, permite la exacta monitorización de su membrana y de su integridad funcional. En este trabajo, realizado con microscopía de fluorescencia, la intensidad de coloración de la parte intermedia ha sido correlacionada con el número de mitocondrias más que con su potencial.

Los trabajos de Auger et al. (1989) en el espermatozoide humano confirman la correlación entre actividad mitocondrial y motilidad espermática computarizada, particularmente significativa tras incubación en un medio capacitante, en el que el parámetro con mayor correlación en los resultados de la citometría ha sido el ALH y menos marcada para los parámetros de velocidad. Tras 24 h de incubación el descenso de la actividad mitocondrial ha sido menos marcado que el de la motilidad.

Recientemente, los estudios de O'Connell et al. (2002), también evidenciaron en el espermatozoide humano una correlación positiva entre la entrada de R123 y la motilidad progresiva del espermatozoide fresco y descongelado. Este trabajo también evidenció que la reducción de la motilidad podría ser justificada por la reducción en la actividad mitocondrial, así como una similitud en la extensión de los daños causados por la criopreservación en las membranas plasmática y mitocondrial, tal como ya lo habían concluido Henry et al. (1993).

Los estudios de Windsor y White (1993) han evaluado el semen de morueco por medio de la determinación cuantitativa de la absorción de R123 por espectrofotometría. Estos trabajos evidenciaron que esta absorción de R123 cambió en presencia de los factores que reducen directamente el potencial de membrana del espermatozoide, reforzando el interés de la utilización

de la R123 como indicador en la evaluación de las lesiones en las membranas derivadas del choque térmico (Windsor y White, 1993).

También se puso de manifiesto que en el proceso de congelación y descongelación (Windsor y White, 1995) se inducía la disminución significativa de la absorción de R123. Por otra parte, las lesiones mitocondriales causadas por la congelación están implicadas en la disminución de la fertilidad del semen descongelado (Windsor, 1997), y que éstas no quedan protegidas por la presencia de glicerol (Windsor y White, 1993).

Además de la R123, el fluorocromo JC-1 es otro marcador mitocondrial que ha sido estudiado en distintos trabajos. Este marcador destaca por su elevada capacidad de diferenciación de las mitocondrias de acuerdo con su potencial de membrana (Garner et al., 1997), diferenciando células con mitocondrias altamente funcionales de células con mitocondrias poco funcionales (Graham, 2001). Este fluorocromo penetra selectivamente en la membrana mitocondrial (Love et al., 2003) permitiendo la identificación de dos poblaciones de espermatozoides: una población que tiñe de rojo-naranja, indicativo que el JC-1 se acumula en la mitocondria bajo la forma de agregados y característico de células que exhiben un elevado potencial de membrana, y una segunda población que tiñe de verde, debido a la presencia de monómeros en el interior de la membrana, característico de células que presentan un bajo potencial de membrana (Thomas et al., 1998). Su aplicación en la evaluación de la funcionalidad mitocondrial ya se encuentra descrita en el hombre (Kasai et al., 2002), en el toro (Thomas et al., 1998), en el caballo (Gravance y col., 2000), en el ratón (Gravance et al., 2001), y en el cerdo (Huo et al., 2002).

Los resultados obtenidos con el empleo de esta tinción han presentado una rigurosa estimación de la función mitocondrial así como, una fuerte correlación con el estado funcional del espermatozoide (Gravance et al., 2000). Otros trabajos destacaron la correlación entre los parámetros de motilidad total (Love et al., 2003), potencial fertilizante (Kasai et al., 2002) y viabilidad (Huo et al., 2002; Love et al., 2003) con la funcionalidad mitocondrial. Estos últimos autores encontraron también correlación entre el potencial de la membrana y el tipo de movimiento espermático, concretamente con los parámetros de motilidad ALH, STR y LIN (Love et al., 2003). De igual modo, los trabajos de Martínez-Pastor et al. (2004), han encontrado alguna correlación entre la actividad mitocondrial medida por el JC-1 y la motilidad total y progresiva.

Otra de las tinciones específicas para mitocondrias es el fluorocromo MitoTracker Deep Red, cuyas moléculas se difunden a través de la membrana plasmática y se unen específicamente a los lípidos de membrana de las mitocondrias funcionales. Las principales ventajas son que presentan especificidad, fotoestabilidad, y elevada sensibilidad al ser incorporado en distintos protocolos (García-Pastor, 2004).

2.3.7 Antecedentes de citometría de flujo y actividad mitocondrial

Utilizando la citometría, se ha reportado la evaluación del porcentaje de espermatozoides con alto PMM como parámetro en especies como bovinos (Hallap et al., 2005), porcinos (De Mercado et al., 2010), ovinos (Pérez, 2009) y alpacas (Cheuquemán et al., 2013).

Hallap et al. (2005) utilizaron el fluorocromo MitoTracker Deep Red para medir la actividad mitocondrial de los espermatozoides frescos y descongelados. Utilizaron toros holsteins para el estudio, encontrando diferencias significativas entre las muestras frescas y las descongeladas.

Cheuquemán et al. (2013) utilizaron el fluorocromo JC-1 para evaluar la actividad mitocondrial de espermatozoides de alpacas, obteniendo como resultado (66,3%) de presencia de alto PMM. Cabe destacar que dicho trabajo solo utilizó muestras frescas, pero no evaluó el efecto de la criopreservación.

Trabajos como los de Santiani et al. (2015) en donde evaluó el PMM de espermatozoides epididimarios frescos de alpacas utilizando el MitoTracker CMXRos y el MitoTracker Deep Red, obteniendo $65,03 \pm 15,92\%$ y $59,52 \pm 19,19\%$ respectivamente para cada fluorocromo. Cabe resaltar que Santiani et al. (2015) solo evaluaron espermatozoides frescos.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de estudio:

Las muestras se obtuvieron del Camal Municipal del Distrito de Ninacaca, provincia de Pasco, departamento de Pasco, y se procesaron en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante el año 2016.

3.2. Tamaño muestral:

El tamaño muestral se calculó utilizando la siguiente fórmula.

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

En donde:

- **n:** Muestras necesarias.
- **Z α :** Valor de Z correspondiente al riesgo deseado (Considerando una significancia de 0.05 y un test unilateral, el Z α es 1.645).
- **Z β :** Valor de Z correspondiente al riesgo deseado (Considerando una Potencia de 0.90, el valor de Z es 1.282).
- **S 2 :** Varianza de la variable. (En donde de acuerdo a Santiani et al., (2016) el D.S. del porcentaje de espermatozoides con alto Potencial de Membrana Mitocondrial es 19%).

- **d:** Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar. Se proyecta una reducción del PMM en un 15%.

Calculando:

$$n = 2 \times (1.645 + 1.282)^2 \times (19)^2 / 152 = 27.49 \text{ testículos}$$

Se decidió trabajar con 41 testículos.

3.3. Obtención de muestras:

Los 41 testículos se obtuvieron de alpacas beneficiadas. Luego del beneficio los testículos se recuperaron, se lavaron con solución fisiológica (NaCl 0.9%) y se colocaron en bolsas herméticas individuales junto con la solución fisiológica. Se almacenaron en cajas transportadoras, utilizando un gel refrigerante para mantener la temperatura a 5°C para posteriormente trasladarlo y evaluarlo en Lima. Los testículos seleccionados midieron un mínimo de 3 cm y tuvieron un peso mínimo de 10g para ser considerarlos en el presente estudio, dado que son adecuados indicadores de la función espermática de un macho adulto.

3.3.1. Preparación del dilutor:

Para la preparación del dilutor se procedió a realizar una mezcla de 19 mL de leche descremada, 1 mL de yema de huevo y 0.970 g de fructosa. A esta mezcla se le añadió 1840 µL del crioprotector dimetilacetamida (DMA) equivalente a una concentración final 1 M. Esta mezcla final se mantuvo temperada a 37.5 °C.

3.3.2. Recuperación de espermatozoides epidimarios:

En el laboratorio se procesó con el retiro de la túnica vaginal visceral de cada testículo, luego se divulsionó para separar el epidídimo y se aisló la cola del epidídimo mediante un corte con tijera Mayo recta y pinza de Adson, se retiró todo el tejido conectivo visible con el mismo instrumental y con el bisel no cortante de una hoja de bisturí se corrió el contenido de los vasos sanguíneos para evitar la contaminación de la muestra. Antes de aislar la cola del epidídimo, se realizó un lavado en PBS y luego se colocó la cola del epidídimo en una placa Petri temperada a 37.5 °C y se le agregó

1mL de dilutor en base a leche descremada para proceder a la liberación, mediante cortes seriados; finalmente se colectó la suspensión en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se mantuvo temperado a 37.5 °C.

3.3.3. Evaluación de calidad seminal (motilidad y concentración):

Para evaluar la motilidad se retiró 10 µL de cada muestra de suspensión de espermatozoides recuperados y se colocaron sobre una lámina porta objeto temperada a 37.5 °C, se cubrió con una lámina cubre objeto y se observó en el microscopio con un objetivo 40X. Para evaluar la concentración de la suspensión de espermatozoides recuperados cada muestra se diluyó en una proporción 1:20 con agua, se recuperó 10 µL de cada dilución y se leyó en la cámara de Neubauer a 400X. Solo aquellas muestras con motilidad $\geq 30\%$ y concentración $\geq 50 \times 10^6$ espermatozoides por mL se procesaron.

3.3.4. Criopreservación:

Para el proceso de criopreservación se utilizó nitrógeno líquido dentro de un sistema de congelamiento automático Cryobath (Cryologic). Las muestras que se procesaron a criopreservación se envasaron en pajillas para posteriormente someterlas en el Cryobath. Se utilizó el programa # 7, en el cual se inició a una temperatura de 18 °C disminuyendo luego hasta 5 °C dentro de un periodo de 90 minutos, para luego mantenerse en esas condiciones por 30 minutos. Posterior a este periodo la temperatura descendió hasta congelarse. Una vez congeladas las pajillas se retiraron y se colocaron inmediatamente en el nitrógeno líquido y se mantuvo ahí hasta el día de su evaluación.

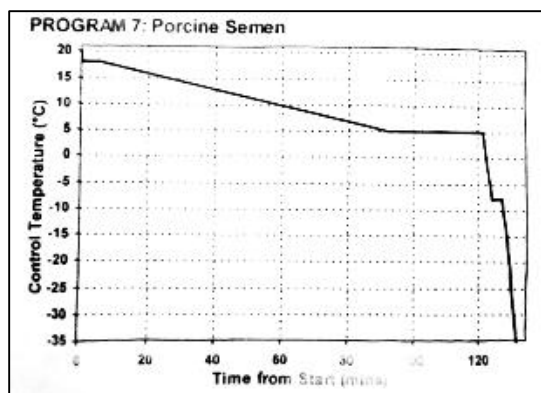


Figura 1. Programa #7 de congelamiento automático Cryobath (Cryologic).

3.3.5. Descongelamiento:

Las pajillas se descongelaron en baño maría a 37 °C durante un minuto, luego se secaron y el contenido de cada pajilla se colocó en un tubo de 1.5 mL para su evaluación.

3.3.6. Evaluación de la motilidad post descongelamiento:

Luego del descongelamiento se tomó 10 µL de cada muestra y se colocó en una lámina porta objeto temperada a 37.5 °, se cubrió con una lámina cubre objeto y se observó en el microscopio con un objetivo 40X para la evaluación de la motilidad.

3.3.7. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial (PMM):

Este parámetro se evaluó utilizando el fluorocromo MitoTracker Deep Red (M22425, Molecular Probes, Estados Unidos), como indicador de PMM. Se realizó antes y después del proceso de criopreservación, para tal efecto cada muestra descongelada se lavó 2 veces por centrifugación con PBS a 600 G por 8 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 150 µL de PBS.

Se preparó una solución stock de MitoTracker Deep Red, para lo cual se diluyó 50 µg en 92 µL de DMSO para llegar a una concentración de 1mM. Se procedió a homogenizar y se prepararon alícuotas de 2 µL guardándolas luego en congelación. Luego se preparó una solución de trabajo para lo cual se diluyó 2 µL de solución stock de MitoTracker Deep Red, con 100 µL de PBS para llegar a una concentración de 20 µM.

Se tomó 100 µL de muestra después del lavado y se agregó 0.5 µL de solución de trabajo de MitoTracker Deep Red 633 (20 µM) para obtener una concentración final de 100 nM, se incubó durante 10 minutos a 38 °C en oscuridad.

3.3.8. Citometría de Flujo:

Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo FlowSight (Amnis) equipado con un sistema analizador de imágenes. Se leyeron diez mil espermatozoides por cada muestra. Para la excitación del MitoTracker Deep Red se utilizó un láser de longitud de onda de 642 nm y la emisión

de la fluorescencia se leyó utilizando el canal de detección 11 (Ch-11): (642 – 740 nm). Los eventos se presentaron utilizando un gráfico tipo histograma, en donde el eje “X” midió la intensidad de fluorescencia del Ch-11 y en el eje “Y” la frecuencia de los eventos. Se consideraron espermatozoides con actividad mitocondrial a aquellos que presentaron fluorescencia roja. Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides con actividad mitocondrial.

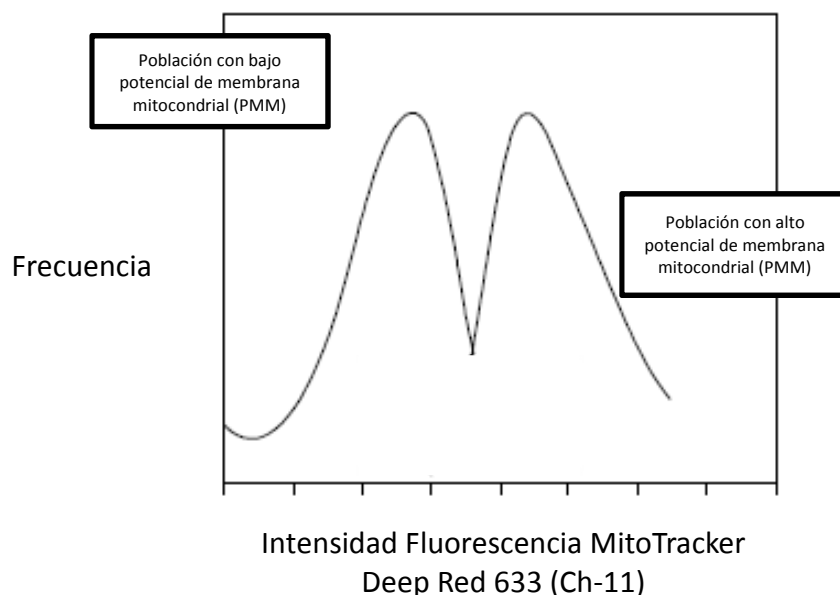


Figura 2. Esquema de presentación de histograma de espermatozoides. Muestra dos poblaciones diferenciadas de espermatozoides.

Dado que el citómetro de flujo cuenta con un sistema análogo de imagen, se observaron fotos de espermatozoides con alto y bajo PMM de los siguientes canales:

- Ch1: Presentado en campo claro (longitud de onda: 435 – 505 nM)
- Ch11: Presentado en campo oscuro (longitud de onda: 642-745 nM)
- Ch1/Ch11: Presentado en campo claro y oscuro (longitud de onda: 435 – 505 nM + 642-745 nM)

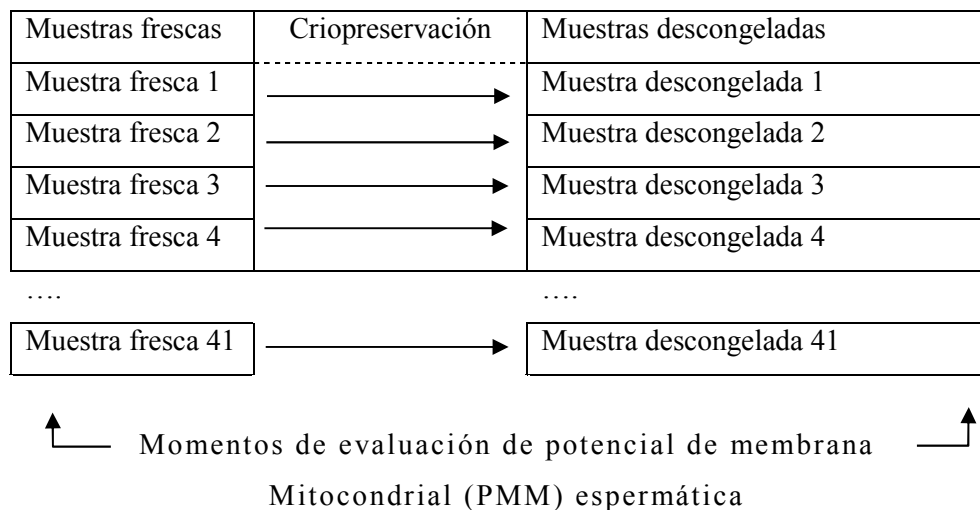
3.3.9. Controles de fluorescencia:

Para la corroboración de los datos se realizó los controles de autofluorescencia, control negativo y control positivo. Los datos se presentaron en 3 histogramas:

- El control de autofluorescencia en donde se analizó las muestras espermáticas a través del citómetro de flujo sin la utilización de algún fluorocromo.
- El control negativo, en el cual las muestras de espermatozoides se indujeron a muerte celular, y luego se evaluaron a través del citómetro de flujo utilizando el fluorocromo MitoTracker Deep Red.
- El control positivo, en el cual una muestra de espermatozoides a condiciones normales se evaluaron a través del citómetro de flujo utilizando el fluorocromo MitoTracker Deep Red 633.

3.3.10. Diseño experimental y observacional:

Dado que el porcentaje de espermatozoides con alto PMM sigue la distribución normal (Santiani et al., 2016), se realizó un diseño de muestras pareadas, en donde se evaluó las 41 muestras obtenidas, divididas en 2 etapas: evaluación de muestras en fresco y evaluación post congelamiento.



*Cada muestra consta de dos alicuotas para evaluación: Muestra fresca y muestra descongelada

Figura 3. Esquema de evaluación del PMM espermática según su etapa de procesamiento.

3.3.11. Análisis de la información:

El promedio de los porcentajes de espermatozoides con alto PMM, frescos y descongelados, se analizaron mediante un estudio de t-Student de muestras pareadas, además los datos se presentaron como media, mediana, coeficiente de variación e intervalo de confianza. Los porcentajes de motilidad y PMM también fueron comparados utilizando la Correlación de Pearson. Se utilizó el programa GraphPad Prism ® versión 3.0.

IV. RESULTADOS

Las muestras frescas y descongeladas de los espermatozoides epididimarios de alpacas se analizaron a través del citómetro de flujo utilizando el fluorocromo MitoTracker Deep Red. Los datos estadísticos de los espermatozoides que presentan alto potencial de membrana mitocondrial (PMM), se presentan en la tabla 1.

Las muestras frescas con elevado PMM, obtuvieron un promedio de 49.82%, una mediana de 51.50%, una desviación estándar de 12.41%, un coeficiente de variación de 24.91% y un intervalo de confianza de 7.84%. Por otro lado las muestras descongeladas con elevado PMM, obtuvieron un promedio de 34.97% una mediana de 35.90%, una desviación estándar de 9.95%, un coeficiente de variación de 28.48% y un intervalo de confianza de 6.29%.

Tabla 1. Espermatozoides epididimarios de alpacas, frescos y descongelados, analizados con el fluorocromo MitoTracker Deep Red para evaluar el PMM.

	Muestras frescas. Espermatozoides con alto PMM. (%)	Muestras descongeladas. Espermatozoides con alto PMM. (%)
Promedio	49.82	34.97
Mediana	51.50	35.90
Desviación Estándar	12.41	9.95
Coeficiente de variación	24.91	28.48
Intervalo de confianza	7.84	6.29

En la tabla 2 se obtiene un valor de $49.82 \pm 12.41\%$ en el PMM de muestras de espermatozoides frescos y un valor de $34.97 \pm 9.96\%$ en el PMM de las muestras de espermatozoides descongelados, encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre ellas al analizar los valores mediante la prueba de t de Student.

Referente a la motilidad, se obtuvo un valor de $46.10 \pm 7.71\%$ en las muestras de espermatozoides frescos y un valor de $24.07 \pm 6.50\%$ en las muestras de espermatozoides descongelados, encontrándose diferencias estadísticas entre ellas al analizar los valores mediante la prueba de t de Student.

Tabla 2. Evaluación del PMM y la motilidad mediante el estudio estadístico de t de Student de espermatozoides epididimarios de alpaca, frescos y descongelados.

	Muestras de espermatozoides frescos	Muestras de espermatozoides descongelados
Alto PMM (%)	49.82 ± 12.41^a	34.97 ± 9.96^b
Motilidad (%)	46.10 ± 7.71^a	24.07 ± 6.50^b

*Letras diferentes líneas indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

En la fig. 4 se presenta algunos ejemplos de los gráficos (histogramas) obtenidos luego del análisis de las muestras de espermatozoides epididimarios de alpaca mediante el citómetro de flujo. En (A) se presenta el control de autofluorescencia del fluorocromo MitoTracker Deep Red, se muestra que no hay emisión de fluorescencia en Ch 11 por lo que todos los eventos forman una sola población ubicada a la izquierda del eje x, indicando bajo PMM. En (B) se presenta el control negativo, espermatozoides inducidos a muerte celular analizados utilizando el fluorocromo MitoTracker Deep Red, se observa que los eventos forman una sola población ubicada a la izquierda del eje x, indicando bajo potencial de membrana mitocondrial. En (C) y (D) se presentan el análisis de muestras frescas y muestras descongeladas, respectivamente. En (C) se puede observar una mayor distribución de eventos localizados a la derecha del eje x y en (D) se puede observar una mayor distribución de eventos localizados a la izquierda del eje x, por lo cual representan una variación en las poblaciones antes y después del proceso de criopreservación.

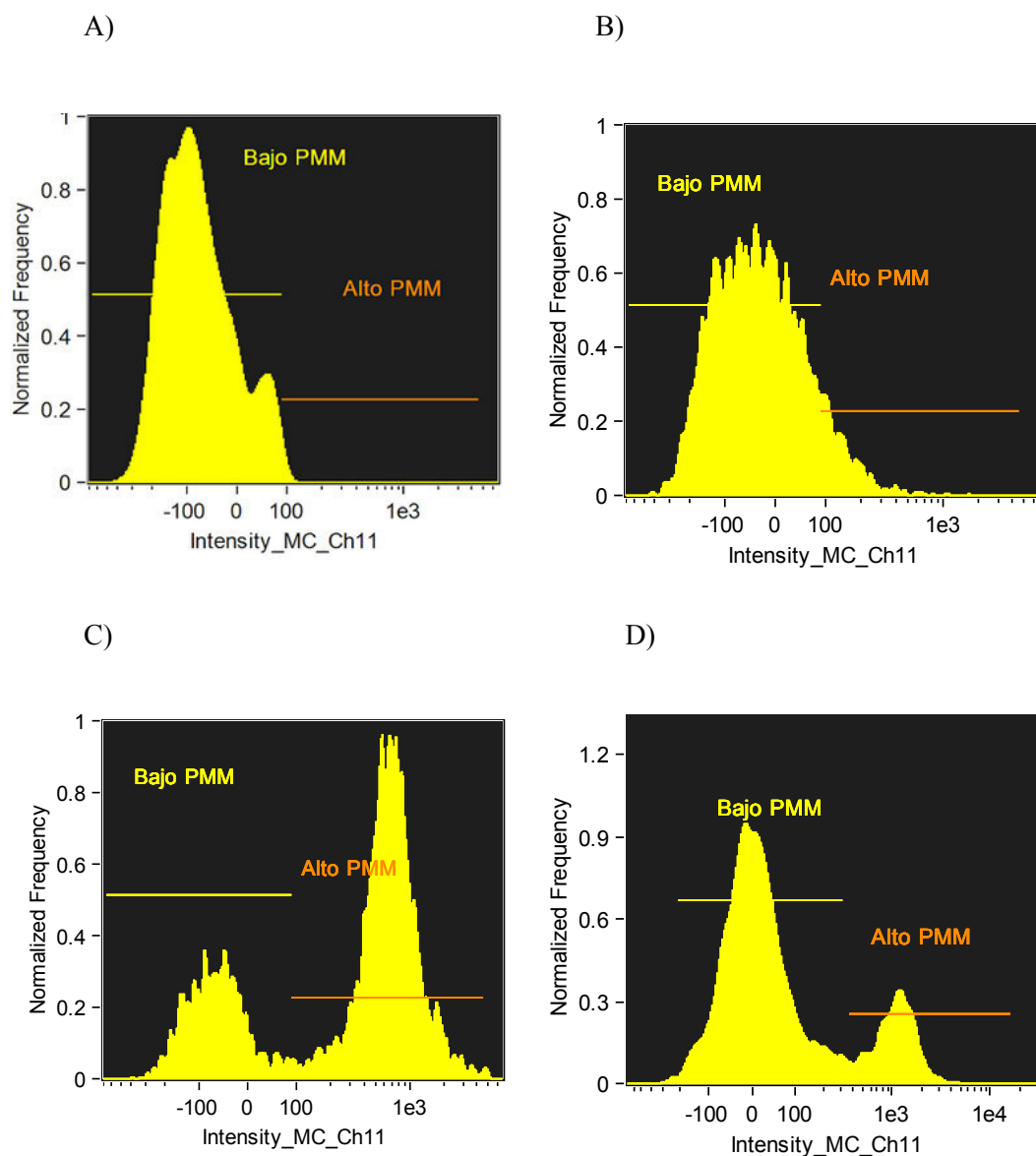
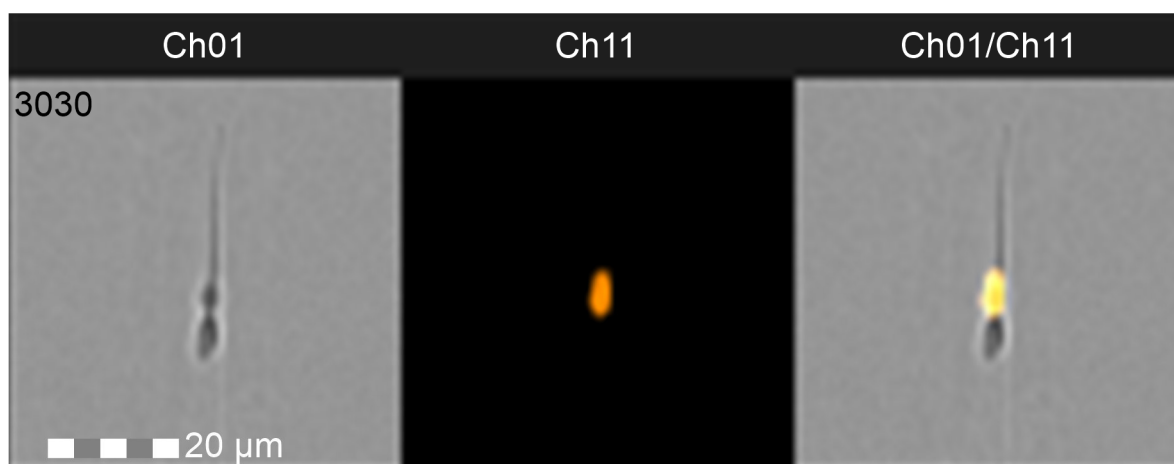


Figura 4. Histogramas de muestras de espermatozoides epididimarios de alpaca analizados mediante el citómetro de flujo. (A) Control de autofluorescencia, muestra de espermatozoides analizados sin utilizar el fluorocromo MitoTracker Deep Red. (B) Control negativo, se analizó espermatozoides inducidos a muerte celular, utilizando el fluorocromo MitoTracker Deep Red. (C) y (D) representan muestras de espermatozoides epididimarios frescos y descongelados, respectivamente, utilizando el fluorocromo MitoTracker Deep Red.

En la figura 5 se presentan fotos de espermatozoides analizados mediante citometría de flujo. El espermatozoide que se observa en fig. 5A pertenece a la población de eventos con alto potencial de membrana mitocondrial, observada mediante el sistema analizador de imágenes del citómetro de flujo utilizando el canal Ch 1 en campo claro, observado de fluorescencia naranja intenso ante la exposición a los filtros para el fluorocromo MitoTracker Deep Red del Ch 11 en campo oscuro y

utilizando los canales Ch 1 y Ch 11 en campo claro y oscuro. En la fig. 5B se presenta un espermatozoide pertenece a la población de eventos con bajo potencial de membrana mitocondrial, observada bajo el sistema analizador de imágenes del citómetro de flujo utilizando el Ch 1 en campo claro, observado ante la exposición a los filtros para el fluorocromo MitoTracker Deep Red del canal Ch 11 en campo oscuro y utilizando los canales Ch 1 y Ch 11 en campo claro y oscuro.

A)



B)

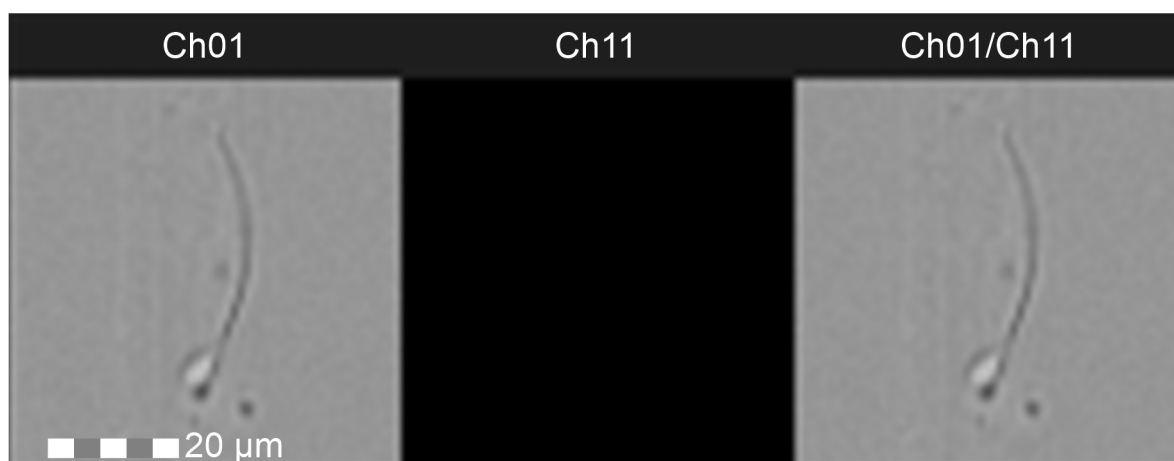


Figura 5: Ejemplos de espermatozoides epididimarios de alpaca evaluados mediante el sistema analizador de imagen del citómetro de flujo. Espermatozoide de alto PMM (A). Espermatozoide de bajo PMM (B).

En la tabla 3 se presenta el análisis de correlación de Pearson entre los valores porcentuales obtenidos entre motilidad y el porcentaje de alto PMM. Se obtuvo una correlación positiva significativa ($p < 0.0001$) con un $r = 0.6271$.

Tabla 3. Correlación de Pearson entre motilidad y el alto potencial de membrana mitocondrial, presentada por espermatozoides epididimarios de alpaca.

Parámetros espermáticos	Correlación de Pearson		Pares (n)
	r	p	
Motilidad vs Alto PMM	0.6271	$p < 0.0001$	82

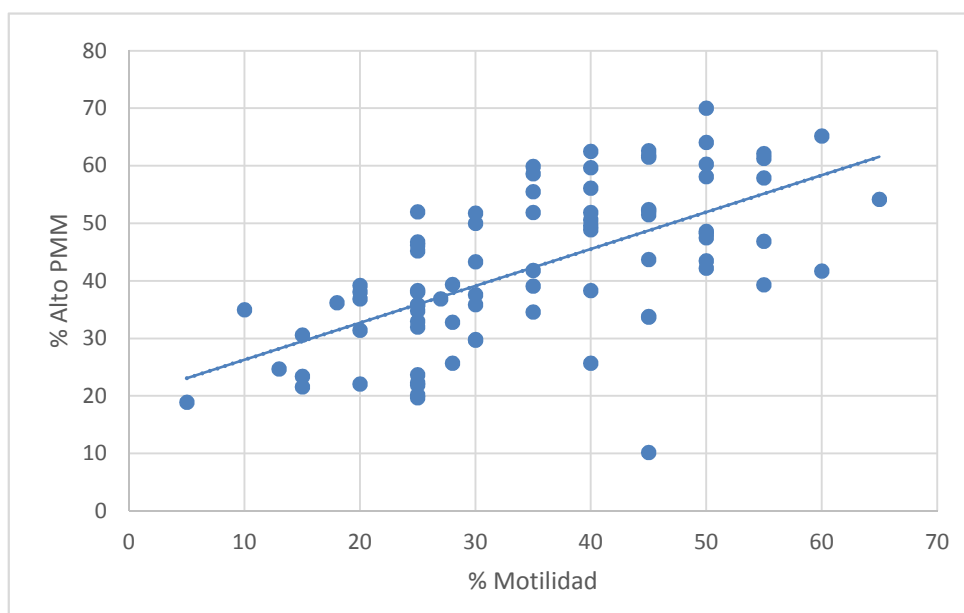


Figura 6. Correlación entre el porcentaje de motilidad y alto PMM, presentada por espermatozoides epididimarios de alpaca.

V. DISCUSIÓN

Este trabajo es el primer reporte que confirma que el potencial de membrana mitocondrial (PMM) disminuye significativamente durante el proceso de criopreservación en espermatozoides epididimarios de alpacas analizados mediante el citómetro de flujo, utilizando el fluorocromo MitoTracker Deep Red 633. El potencial de membrana mitocondrial (PMM) es la diferencia de voltaje a través de la membrana mitocondrial, el cual es un componente importante de la fuerza protón-motriz en las mitocondrias que se utiliza para realizar la síntesis de ATP.

De lo anterior, esperamos encontrar valores elevados de alto PMM en muestras espermáticas frescas. En este trabajo obtuvimos un valor alrededor de 50%, estos resultados son ligeramente inferior a los descritos previamente por Santiani et al. (2016) donde obtuvieron alrededor de 59% de alto PMM utilizando también el fluorocromo MitoTracker Deep Red 633. Santiani et al. (2016) evaluaron también espermatozoides utilizando el fluorocromo CMXRos obteniendo valores de alto PMM alrededor de 65% encontrándose también por encima de nuestros resultados. Cabe resaltar que el factor estacional puede influir en las diferencias de resultados, en nuestro trabajo se recolectaron las muestras durante los meses de verano (entre enero y mayo del 2016) y Santiani et al. (2016) las recolectaron durante los meses de primavera (entre setiembre y enero del 2016), por lo que tal como indican Urquieta et al. (1991), en donde los meses de mayor reproducción corresponden entre marzo y mayo, y teniendo en consideración el tiempo atrás en la que se produjo los espermatozoides utilizados, explicarían los valores de Santiani et al. (2016) que obtuvieron valores por encima a los de este trabajo. Por otro lado Cheuqueman et al. (2013) evaluó muestras de eyaculado de alpaca utilizando el fluorocromo JC-1 obteniendo un valor de alto PMM alrededor de 66% encontrando a este valor por encima al nuestro, no obstante cabe mencionar que Cheuqueman et al. (2013) seleccionaron 6 alpacas de comprobada fertilidad y bajo buenas condiciones propias de animales destinados a empadre, a diferencia de nuestro trabajo en donde las muestras se extrajeron de alpacas previamente beneficiadas.

Posterior al proceso de criopreservación la calidad espermática disminuyó significativamente, luego de la descongelación el porcentaje de espermatozoides con alto PMM descendió a 35%. Resultados similares obtuvieron Santiani et al. (2015), encontrando un 25% de alto PMM en espermatozoides epididimarios de alpaca, utilizando en este caso el fluorocromo MitoTracker Red

CMXRos. Tal como indicamos anteriormente, hasta el momento no se ha reportado más resultados de PMM de espermatozoides de alpaca luego del proceso de criopreservación, sin embargo se tiene reportes de valores obtenidos en otras especies, como el trabajo de Hallap et al. (2004) donde se evaluó eyaculados de toros utilizando también el fluorocromo MitoTracker Deep Red, los espermatozoides descongelados presentaron alrededor de 48% de alto PMM, cabe resaltar que sus muestras antes del proceso de criopreservación, presentaron un 69% de alto PMM. Tal como se viene considerando desde hace algún tiempo, la medición del alto PMM es otro parámetro que indica la calidad de la muestra espermática, por lo que la disminución de los valores de alto PMM luego del proceso de criopreservación se podría explicar debido al daño celular sufrido por los espermatozoides durante este proceso.

Con respecto a la motilidad, los valores en este trabajo tuvieron variaciones significativas al igual que los obtenidos en PMM. Las muestras de espermatozoides frescos obtuvieron un valor de 46% y las muestras de espermatozoides descongelados un valor de 24%. Valdivia et al. (1999) utilizaron muestras seminales de alpaca y obtuvieron también una variación considerable en su motilidad, obtuvo 60-98% en muestras frescas, descendiendo luego del descongelamiento a 15-20%. Posteriormente Santiani et al. (2005) utilizaron muestras seminales recolectadas por vagina artificial, donde obtuvieron motilidades de 72% en muestras frescas y 20% en muestras descongeladas, encontrando diferencias significativas. Cabe resaltar que Santiani et al. (2005) utilizaron muestras de cuatro alpacas seleccionadas y monitoreadas, criadas bajo cuidados de buena alimentación, explicándose valores de motilidad de las muestras frescas por encima de los obtenidos en nuestro trabajo. Respecto a las muestras descongeladas, los valores de motilidad obtenidos en este trabajo fueron mayores a los reportados por Santiani et al. (2005), sin embargo se debe tener en consideración las diferencias durante la técnicas de congelación, la utilizada en este trabajo fue un método automático, óptimo a utilizar ya que minimiza el daño celular durante la criopreservación.

Por otro lado se reportan estudios en otros camélidos sudamericanos, donde también se observan diferencias significativas en motilidades antes y después del proceso de criopreservación. En el trabajo de Von Baer y Hellemann (1999) se utilizó semen colectado en llamas mediante vagina artificial, se seleccionó aquellas muestras frescas que superaron el 45% de motilidad para criopreservarlas reduciendo luego sus valores hasta 16-28%. El trabajo de Aller et al. (2003) presentan también diferencias significativas entre la motilidad de muestras seminales frescas de 54% y muestras seminales descongeladas de 20%. Independientemente de la especie en estudio y a la técnica de recolección de muestras espermáticas, se reportan al igual que en nuestro trabajo reducción significativa en la motilidad luego del proceso de criopreservación. Se desconoce los

mecanismos específicos por los que la criopreservación daña la calidad espermática, sin embargo en términos generales se someten a los espermatozoides a diferentes condiciones físicas y químicas durante el proceso de congelación y descongelación, razón por la que disminuye el porcentaje de calidad espermática explicando las variaciones significativas de parámetros de calidad espermáticas en este trabajo y en los reportados anteriormente.

Tal como indica O'Connell et al. (2002) teóricamente hay una relación directa entre motilidad y PMM, evaluar las mitocondrias tiene su importancia en determinar la producción de ATP (adenosina-tri-fosfato), producido por fosforilación oxidativa y necesario para la motilidad. El interés en evaluar esta estructura deriva de la importancia de las mitocondrias en la producción de ATP (adenosina-tri-fosfato), producido por fosforilación oxidativa y necesaria para la motilidad y la fertilización (O'Connell et al., 2002). Al utilizar la correlación de Pearson entre los valores obtenidos en este trabajo de motilidad y PMM obtuvimos un $p < 0.0001$, encontrándose a ambos parámetros relacionados entre sí. El coeficiente de correlación lineal de Pearson es de 0.6271, encontrándose que la relación existente entre ambas es positiva, entre moderada y fuerte y significativa. Esta correlación corroboraría las afirmaciones de Piomboni et al. (2012) donde sustenta que las mitocondrias son la fuente de energía principal para la movilidad de los espermatozoides, característica necesaria para lograr la fecundación. En conclusión el porcentaje de PMM de los espermatozoides desciende significativamente luego del proceso de criopreservación afectando negativamente la calidad de la muestra espermática.

VI. CONCLUSIONES:

- El potencial de membrana mitocondrial (PMM) de las muestras espermáticas se ve reducida luego del proceso de criopreservación.
- El PMM es un parámetro de calidad espermática que tiene directa relación con la motilidad.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Albers M y Barrios D. 2006. Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros postmortem obtenidos mediante lavado retrógrado. En: XIII Congreso de Producción e Industria Animal.
2. Aller J, Ferre L, Rebuffi G y Alberio R. 1997. Recolección de semen de llama (*Lama glama*) en la Puna argentina. *Rev Vet Arg* 132: 104-107.
3. Aller J, Rebuffi G, Cancino A y Alberio R. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*lama glama*). *Arch Zootec* 52: 15-23
4. Amaral A y Ramalho-Santos J. 2010. Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. *Int J Androl* 33: 180 - 186.
5. Andrade A. 2005. Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 287 p.
6. Apaza N, Sapan R, Huanca T y Huanca W. 2001. Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. *Rev Inv Vet Perú* 1: 435 – 438.
7. Auger J, Ronot X, Dadoune J. 1989. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *Int J Androl* 10: 439 - 448.
8. Auger J, Leonce S, Jouannet P, Ronot X. 1993. Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *J Histo Cytochemistry* 41: 1247-1251.
9. Barrera L, Drago E, Pérez J, Zamora A, Gómez F. 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Mex* 1: 42-55.
10. Bravo P, Ordoñez C, Alarcón V. 1996. Semen processing and freezing of alpacas and llamas. En: 13mo ICAR. Sydney, Australia.
11. Bravo W, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: 619-626.
12. Bravo P, Skidmore A y Zhao X. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Anim Reprod Sci* 62: 73–93.

13. Burgel H, Erhardt G, Gauly M. 2001. Cryopreservation of llama (lama glama). Spermatozoa with. On egg yolk. Free extender, in Gerken M. Renieri C, (eds) progress in south American Camelids Research. Theriogenology 57: 213-222.
14. Bustinza A. 2001. La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje, Universidad Nacional del Altiplano. 343 p.
15. Carra E, Sangiorgi D, Gattuccio F, Rinaldi A. 2004. Male infertility and mitochondrial DNA. Biochem Biophys Res Commun 322: 333-339.
16. Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, Vázquez J, Martínez E y Roca J. 2004. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. J Androl 25: 389 - 396.
17. Castelo T, Rodríguez T y Rodriguez A. 2008. Considerations on Goat Semen Cryopreservation. Acta Vet Bras 2: 67-75.
18. CENAGRO. 2012. Lima: IV Censo nacional agropecuario 2012. Disponible en: <http://www.censos.inei.gob.pe>
19. Chenoweth P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. Theriogenology 43: 217- 229.
20. Chen L, Summerhayes I, Johnson L, Walsh M, Bernal S, Lampidis T. 1982. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology. 46: 141-155.
21. Cheuquemán C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sánchez R, y Risopatrón J. 2013. Assessment of Sperm Function Parameters and DNA Fragmentation in Ejaculated Alpaca Sperm (Lama Pacos) by Flow Cytometry. Reprod Domest Anim. 48: 447-453.
22. Comizzoli P, Mermillo P, Cognie Y, Chai N, Legendre X, Mauge R. 2001. Succesful in vitro production of embryos in the red deer (Cervus elaphus) and the sika deer (Cervus nippon). Theriogenology 55: 649-659.
23. De Baulny B, Le Vern Y, Maisse G. 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) spermatozoa. Cryobiology 34: 141-149.
24. De Los Ríos E. 2006. Producción textil de fibras de camélidos sudamericanos en el área alto-andina de Bolivia, Ecuador y Perú. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (UNIDO). Disponible en: <https://www.unido.org>
25. De Mercado E, Rodriguez A, Gómez E, Sanz E. 2010. Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison of different freezing extenders based on post-thaw sperm quality. Anim Reprod Sci 118: 54-61.
26. Downing T, Garner D, Ericsson S, Redelman D. 1991. Metabolic toxicity of fluorescent stains on thawed cryopreserved bovine sperm cells. J Histo Cytochemistry 39: 485-489.

27. Ericsson S, Garner D, Thomas C, Downing T, Marshall C. 1993. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoa function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 39: 1009 - 1024
28. Evenson D, Darzynkiewicz Z, Melame D. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histo Cytochemistry* 30: 279 - 280.
29. FAO. Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. 2005.
30. Fernández D. 2006. Transferencia de embriones. Repartido de curso Técnicas Reproductivas. Facultad de Agronomía. UDELAR. 98 p.
31. Fernández-Baca S y Calderón W. 1965. Métodos de colección de semen de alpaca. *Rev. Univ Nac Mayor de San Marcos IVITA* 12: 12-16.
32. Fernández-Baca S y Novoa C. 1968. Primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen de vicuña (*Vicugna vicugna*). *Rev Fac Med Vet* 22: 9-18.
33. Fernández-Baca S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Anim Reprod Sci* 33: 307-323.
34. Fraser L, Lecewicz M, Strzezek J. 2002. Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Pol J Vet Sci* 5: 85-92.
35. García W. 2014. Optimización de los protocolos de criopreservación de semen ovinos de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranese. Tesis Doctoral. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. 315 p.
36. García-Pastor L, González J, Figueras L, Callejas M, Cebrián L, Espada M. 2004. Implantes de melatonina en moruecos. Efecto sobre algunos índices reproductivos en un rebaño de raza Rasa Aragonesa. *SEOC* 29: 149-151
37. Garnica J, Flores E, Bravo W. 1995. Citric Acid and Fructose concentration in seminal plasma of alpacas. *Small Rumin Res* 18: 95-98.
38. Garner D, Thomas C, Joeng H, De Jarnette J. 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 57: 1401-1406.
39. Gauly M y Leindinger H. 1995. Semen quality characteristics, volume distribution and hypo osmotic sensitivity of spermatozoa of *Lama glama* and *Lama guanicoe*. En: 2da European Symposium of South American Camelids. Roma: UNICAM
40. Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. 2007. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci* 118: 54-61

41. Garde J, Aguado M, Perez S, Garrido D, Perez-Guzman M, Montoro V. 1994. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem. *Theriogenology* 41: 2003.
42. Garner D, Thomas C, Joerg H. 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 57: 1401-1406.
43. Gibbons A, García J, Wolf M y Arrigo J. 2003. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Estación experimental agropecuaria barrichole, Instituto Nacional Agropecuario. *Rev Vet Arg* 32: 8-14.
44. Graham J, Kunze E, Hammerstedt R. 1990. Analysis of sperm viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 43: 55-64.
45. Graham J. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 68: 239-247.
46. Gravance C, Garner D, Baumber J. 2000. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology* 53: 1691-1703.
47. Gravance C, Katz P, Willis W, Fazeli A. 2001. Early degradation of paternal mitochondria in domestic pig is prevented by selective proteasomal inhibitors lactacystin and MG 132. *J Androl* 25: 317-25.
48. Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2005. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by Mitotracker Deep Red 633. *Theriogenology* 63: 2311-2322.
49. Harrison R y Vickers S. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 8: 343-352.
50. Harrison R, Gadella B. 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63:342-351.
51. Henry M, Noiles E, Gao D, Mazur P y Critser J. 1993. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil Steril* 60: 911-918.
52. Huanca W y Gaulty M. 2001. Conservación de semen refrigerado de llamas. *Rev Inv Vet Perú* 1: 460-461.
53. Huanca W y Adams G. 2007. Semen Collection and Artificial Insemination in Llamas and Alpacas. *Theriogenology* 2: 869-873.
54. Huo L. 2002. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 58: 1349-1360.
55. Iñiguez L y Alem R. 1996. Role of camelids as means of transportation and exchange in the Andean region of Bolivia. *Rev World Anim* 86: 12-21.

56. James A, Green H, Hoffman S, Landry A, Paccamonti D y Godke R. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology* 58: 401-404.
57. Johnson L, Walsh M, Chen L. 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl. Acad Sci USA* 77: 990-994.
58. Jones R y Stewart D. 1979. The effects of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 56: 233-234
59. John J y John B. 2011. Sperm mitochondrial DNA. *Int. J Sperm Chromatin* 3: 81-94.
60. Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo J, Rouissi H, Herraes P, Mann T, Lutwak Mann C. 1981. Male Reproductive Function and Semen. Springer-Verlag 25: 78-95.
61. Kasai T, Ogawa K, Mizuno K. 2002. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl* 4: 97-103.
62. Karabinus D, Evenson D, Kaproth M. 1991. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of crypreserved bull sperm. *J Dairy Sci* 74: 3836-3848.
63. Leyva V, Franco E y Sumar J. 1977. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos. Lima. En: I Reunión Cient. Anual de la Asoc. Peruana de Prod. Animal.
64. Lichtenwainer A, Woods B y Weber J. 1996. Seminal collection, seminal characteristics and pattem of ejaculation in llamas. *Theriogenology* 46: 293-305.
65. Liesa M, Palacin M, Zorzano A. 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 89: 799-845.
66. Logan D. 2007. The mitochondrial compartment. *J Exp Bot* 58: 1225-1243.
67. Love C. 2003. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology* 60: 1127-1138.
68. Manosalva I, Cortés C, Leyva V, Valdivia M, De los Reyes M, Barros C y Moreno R. 2005. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, Integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Rev Inv Vet Perú* 16: 4-12
69. Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. 2002. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 17: 1257-1265.
70. Martinez-pastor F, Johannisson A, Gil J. 2004. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* 84: 121-133.
71. McEvoy T, Kyle C, Slater D, Adam C, Bourke D. 1992. Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *J Reprod Fert* 9: 48-49

72. Membrillo A, Córdova A, Hicks J, Olivares I, Martinez V y Valencia J. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *J Cell Sci.* 131: 224-238.
73. Mogrovejo D. 1952. Estudios del semen de la alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Facultad Medicina Veterinaria UNMSM. 67 p.
74. Montaldo H y Meza-Herrera C. 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *J biotechnology* 1: 23-43.
75. Moore A, Squires E, Bruemmer J y Graham J. 2006. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *J Equine Vet* 26: 215-218.
76. Morel M. 1999. Equine artificial insemination. 7a ed. USA: CABI Publishing New York. p 406-446.
77. Mortimer S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Repr Update* 3: 403-439.
78. O'Connell M, McClure N, Powell L, Steele E, Lewis S. 2002. Differences in mitochondrial and nuclear DNA status of high-density and low-density sperm fractions after density centrifugation preparation. *Fertil Steril* 79: 754-762.
79. Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galán Y, Varela-Fernández E, Gallardo-Bolaños J. 2008. Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J Androl* 29: 213-221.
80. Pacheco C. 1996. Efecto de la tripsina y colagenasa sobre el acrosoma del espermatozoide y su relación con la fertilidad del semen de alpaca. Tesis MVZ. Arequipa: Universidad Católica de Santa María, Arequipa. 52 p.
81. Palacios C. 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides. En: V Reunión de reproducción bovina. Bogotá. CGR Colombia.
82. Palma G. 2001. Producción in vitro de embriones. *Biotec Reprod* 1: 24-37
83. Peterson N y Freund M. 1970. ATP synthesis and oxidative metabolism in human spermatozoa. *Biol Reprod* 3: 47-54.
84. Perez E. 2006. Effect of glutathione on ovine cryopreserved sperm function and oxidative status. Tesis Médico Veterinario. Sao Paulo. Universidad de São Paulo. 60 p.
85. Pérez M, Apaza E y Deza H. 2009. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en el buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol. En: 11mo simposio internacional. Arequipa. Investigación sobre camélidos sudamericanos.
86. Peña F, Rodriguez H. 2006. Citometria de flujo: aplicaciones en el estudio del espermatozoide porcino. En: Manual de Tecnicas de Reproducción Asistida en Porcinos. 7a ed. España. Bonet, S.-Martínez, E. p: 133-143.

87. Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A y Zara V. 2012. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *J Androl* 35: 109-124.
88. Quispe E. 2005. Mejoramiento genético y medioambiental de alpacas en la región de Huancavelica. En: 1er Proyecto de inversión pública a nivel de perfil. Huancavelica: Área estatal del medio ambiente.
89. Quispe E, Mueller J, Ruiz J, Alfonso L y Gutiérrez G. 2009. Actualidades sobre adaptación, producción, reproducción y mejora genética en camélidos. 1era ed. Perú. p. 93 - 112.
90. Robaire B y Viger R. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52: 226-236.
91. Santiani A, Huanca W, Sapaná R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J Androl* 7: 303-309.
92. Santiani A, Ugarelli A, Evangelista S, Choez K, Pacheco J. 2015. Evaluación de diferentes concentraciones de FITC-PSA y FITC-PNA para la valoración de la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca. *Anim Reprod Sci* 5: 87-92
93. Santiani A, Ugarelli A, Evangelista S. 2016. Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 173: 49-55.
94. San Martín M. 1961. Fisiología de la reproducción de la alpaca. *Problemas en ganaderos* 1: 121- 131.
95. San Martín M, Copaira M, Zuñoga J, Rodríguez R, Bustinza G, Acosta L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertility* 16: 395-399
96. Segovia M, Jenkins J, Paniagua-Chavez C, Tiersch T. 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology* 53: 1489-1499.
97. Silva A, Cardoso R, Uchoa D. y Silva L. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59: 821-829.
98. Stornelli M, Tittarelli C, Savignose C y Stornelli M. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Rev Vet Arg*: 3: 28-35
99. Suen D, Norris K, Youle R. 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *J Genes Dev* 22: 1577-1590.
100. Sumar J y Leyva V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca. En: IV Conv. Int. en camélidos sudamericanos. Lima. Producción animal.
101. Tait S y Green D. 2012. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci* 125: 807-815.

102. Thomas C, Garner D, Dejarnette J. 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 58: 786-793.
103. Tucker M, Ahuja K, Stevens P, Craft I. 1986. Cryopreservation of human spermatozoa: an assessment of methodology using rhodamine 123. *Arch Androl* 17: 179-187
104. Urquieta B, Cepeda R, Cáceres J, Raggi L, Rojas J. 1994. Seasonal variation in some reproductive parameters of male vicuña in the High Andes of northern Chile. *J Arid Environ* 26: 79-87
105. Valdivia M, Ruiz M, Bermúdez L, Quinteros S, Gonzales A, Manosalva I, Ponce C, Olazábal J, Dávalos R. 1999. Criopreservación de semen de alpacas. En: II congreso Mundial sobre camélidos. Cusco, Perú, 4-7 noviembre, pp 81.
106. Vasconcelos-Filho, F. 2010. Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino. Tesis Máster. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 215 p.
107. Vaughan J, Galloway D y Hopkins D. 2003. Artificial insemination in alpacas (Lama pacos). Kingston, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation. 90 p.
108. Von Baer L, Hellemann C. 1999. Cryopreservation of Llama (Lama glama) semen. *Reprod Dom Anim* 34, 95-96.
109. Wang X, Wang L y Liu X. 2003. The quality and processing performance of alpaca fibres. *J fibre industry* 3: 128
110. Windsor D, White I. 1995. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim Reprod Sci* 40: 43-58.
111. Windsor D, White I. 1993. Assessment of ram sperm mitochondrial function by quantitative determination of sperm rhodamine 123 accumulation. *Mol Reprod Dev* 36: 354-360.
112. Windsor D. 1997. Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reprod Fertil* 9: 279-284.
113. Xungai W, Lijing W, y Xiu L. 2003. The quality and processing performance of alpaca fibres. *RIRDC* 128:119-127.
114. Yu I, Songsasen N, Godke R. 2002. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology* 44: 62-78.